



DEUTSCHES
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: P 34 30 320.0
22 Anmeldetag: 17. 8. 84
43 Offenlegungstag: 28. 3. 85

DE 3430320 A1

30 Unionspriorität: 32 33 31
18.08.83 JP P58-149688

71 Anmelder:
Nihon Seiyaku Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

74 Vertreter:
Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Vossius, D.,
Dipl.-Chem.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

72 Erfinder:
Shibata, Yasuo, Yokohama, Kanagawa, JP; Suehiro,
Takeshi, Chiba, JP

Patentamt

54 Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin-Präparaten mit verminderter Komplementaktivität

Beschrieben ist ein Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin-Präparaten mit verminderter Komplementaktivität. Rohes Immunglobulin, z. B. Immunglobulinpaste der Cohn-Fraktion II oder II + III, wird in einer 0,5 bis 2,0% (Gew./Vol.) Aminoessigsäure enthaltenden Lösung bis zu einer Proteinkonzentration von 3,0 bis 5,0% (Gew./Vol.) gelöst und auf einen pH-Wert von 6,0 bis 7,0 eingestellt. Sodann wird die Lösung mit Polyäthylenglykol 4000 bis zu einer Konzentration von 6,0 bis 7,0% (Gew./Vol.) versetzt. Die entstandene Fällung aus aggregierten Immunglobulinen und verunreinigenden Proteinen wird abgetrennt. Danach wird der Überstand auf einen pH-Wert von 7,0 bis 8,0 eingestellt und mit Polyäthylenglykol 4000 auf eine Konzentration von 10,0 bis 15,0% (Gew./Vol.) eingestellt. Es wird eine Fällung von hochreinem Immunglobulin mit niedriger antikomplementärer Aktivität erhalten. Das erhaltene Immunglobulin kann noch weiter behandelt werden, um seine antikomplementäre Aktivität bzw. seinen Gehalt an Polyäthylenglykol noch weiter zu vermindern.

DE 3430320 A1

1

5 u.Z.: T 209
Case: 8672

NIHON SEIYAKU CO., LTD.
Tokyo, Japan

10

" Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin-Präparaten mit
verminderter Komplementaktivität "

15 Priorität: 18.8.1983, Japan, Nr. 149 688/83

P a t e n t a n s p r ü c h e

20

1. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin-Präparaten
mit verminderter Komplementaktivität, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß man eine Lösung von rohem
Immunglobulin mit einer Proteinkonzentration von 3,0 bis 5,0 %
25 (Gew./Vol.), einer Aminoessigsäurekonzentration von 0,5 bis
2,0 % (Gew./Vol.) und einem pH-Wert von 6,0 bis 7,0 mit Poly-
äthylenglykol 4000 bis zu einer Konzentration von 6,0 bis
7,0 % (Gew./Vol.) versetzt, die entstandene Fällung von aggre-
giertem Immunglobulin abtrennt, den Überstand auf einen pH-
30 Wert von 7,0 bis 8,0 einstellt und mit Polyäthylenglykol 4000
bis zu einer Konzentration von 10,0 bis 15,0 % (Gew./Vol.)
versetzt und die erhaltene Fällung von hochreinem Immun-
globulin isoliert.

35 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
man zur weiteren Verminderung der Komplementaktivität die
erhaltene Fällung von hochreinem Immunglobulin in einem
Lösungsmittel

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herabsetzung der Polyäthylenglykol-Konzentration die Lösung des hochreinen Immunglobulins bei niedriger Temperatur mit Äthanol versetzt und die erhaltene Fällung isoliert.

20

25

30

35

1

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin-Präparaten mit verminderter Komplementaktivität (antigenunabhängiger Komplementaktivierung) zur intravenösen Anwendung.

10 Immunglobulin-Präparate werden durch verschiedene Aufbereitungsverfahren aus dem Serum isoliert, wobei meist Neutralsalze oder Äthanol nach Cohn et al., J. Am. Chem. Soc., Bd. 68 (1946), 459, zur Ausfällung verwendet werden. Ausgangsmaterial ist immer ein Pool aus dem Plasma von mindestens 1000 gesunden, freiwilligen Spendern. Diese sogenannten Standard-Immunglobuline führen bei intravenöser Anwendung
zu schwerwiegenden Nebenreaktionen. Es sind zahlreiche Verfahren zur Herstellung intravenös applizierbarer Immunglobuline bekannt. Einige Präparate zur intravenösen Anwendung sind bereits auf dem Markt. Beispiels-
20 weise wurde Immunglobulin mit Pepsin oder Plasmin behandelt, wobei der Komplement-bindende und Nebenreaktionen verursachende Fc-Teil des Moleküls soweit abgespalten wurde, bis die sogenannte antikomplementäre Aktivität bzw. Komplementaktivität praktisch beseitigt war. Damit ging jedoch die nat-
25 türliche Halbwertszeit von etwa 3 Wochen verloren. Eine weitere Methode besteht in der chemischen Modifizierung der Disulfid-Bindungen des Immunglobulins z.B. durch Sulfonierung oder reduktive Alkylierung, um die Komplementaktivierung zu vermindern.

30

Ferner sind Verfahren zur Herstellung von aggregatarmen bzw. aggregatfreien Immunglobulin-Präparaten durch Fraktionierung mittels wasserlöslicher Polymere, insbesondere Polyäthylenglykole, bekannt. So ist beispielsweise in der US-PS 4 124 576 ein
35 Verfahren zur Herstellung von intravenös applizierbarem Gammaglobulin mit niedriger antikomplementärer Aktivität

L

J

1 beschrieben, bei dem die Cohn-Fraktion II mit Wasser niedri-
ger Ionenstärke, das Albumin und 2 % Polyäthylenglykol (PEG)
enthält, extrahiert wird. Sodann wird die PEG-Konzentration
auf 4 % (Gew./Vol.) erhöht, und Verunreinigungen werden abge-
5 trennt. Sodann wird Äthanol bis zu einer Konzentration von 4
bis 12 % zugegeben, wobei weitere Verunreinigungen ausgefällt
werden. Danach wird das Gammaglobulin durch Zugabe von PEG
bis zu einer Konzentration von 10 bis 12 % (Gew./Vol.) oder
durch Zugabe von Äthanol bis zu einer Konzentration von 20
10 bis 30 % (Vol./Vol.) bei einem pH-Wert von 7 bis 8,2 ausge-
fällt. Das gesamte Verfahren wird bei einer Temperatur von et-
wa 0 bis -6°C durchgeführt.

Aus der JA-AS 12 001/1980 ist ein Verfahren zur Herstellung
15 von intravenös applizierbaren Gammaglobulin bekannt, bei
dem eine 1- bis 30%ige Lösung von Hydroxyäthylstärke mit
einem pH-Wert von 3,5 bis 8,0, insbesondere 6,5 bis 6,9, mit
einer Lösung von Gammaglobulin und einer 10%igen PEG-Lösung
versetzt wird, die entstandene Fällung von aggregiertem Gamma-
20 globulin abgetrennt und der Überstand mit einer 20%igen PEG-
Lösung versetzt wird. Ferner sind Verfahren zur Reinigung
verschiedener Plasmaproteine bekannt (Vox Sang., Bd. 31 (1976),
141, und Folia Haematologica, Bd. 103 (1976), 938), bei denen
mit PEG gereinigtes Immunglobulin oder eine Lösung der Cohn-
25 Fraktion II zur Abtrennung von aggregierten Immunglobulinen
mit 6 bis 10 % Hydroxyäthylstärke und 0,5 bis 2,5 % Bentonit
versetzt wird.

Aus der JA-OS 47 628/1980 ist ein Verfahren zur Herstellung
30 von intravenös applizierbarem Gammaglobulin bekannt, bei
dem 60 bis 90 g/Liter PEG zu einer Lösung von Immunglobulin
gegeben werden. Die entstandene Fällung wird abgetrennt und
die PEG-Konzentration wird auf 70 bis 100 g/Liter eingestellt.
Es wird das gewünschte Gammaglobulin als Fällung erhalten.

35

Als der JA-AS 38 932/1980 ist ein Verfahren zur Reinigung von

1 Immunglobulin bekannt, bei dem aggregierte Immunglobuline in Gegenwart von 4 bis 4,8 % eines Polyalkylenglykols mit einem Molekulargewicht von 6000 bis einem pH-Wert von 4 bis 5 abgetrennt werden.

5

Schließlich ist aus der JA-OS 206 625/1982 ein Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin G bekannt, das keine antikomplementäre Aktivität besitzt, bei dem eine Lösung der Cohn-Fraktion II mit 1 bis 3 % eines Polyäthylenglykol-Polypropylen-
10 glykol-Blockcopolymers versetzt und unlösliche Substanzen mittels Aktivkohle als Filtrierhilfe abfiltriert werden.

Erfindungsgemäß wurden die Bedingungen untersucht, bei denen aggregierte Immunglobuline aus einem Immunglobulin-Material, z. B.
15 der Cohn-Fraktion II, mit PEG 4000 abgetrennt werden. PEG 4000 entspricht Macrogol 4000 des Japanischen Arzneibuches. Dabei wurde folgendes festgestellt: Bei der Abtrennung von aggregierten Immunglobulinen aus rohem Immunglobulin mit PEG 4000 ist die Zusammensetzung und der pH-Wert des Lösungsmittels von entscheidender Bedeutung. Die Gegenwart von Amino-
20 essigsäure (Glykokoll) ermöglicht die selektive Ausfällung der aggregierten Immunglobuline. Auf diese Weise wird reines Immunglobulin erhalten, das intravenös gegeben werden kann. Durch anschließende Behandlung mit einem Anionenaustauscher
25 wird die antikomplementäre Aktivität des Immunglobulins noch weiter vermindert. Zur Abtrennung von PEG aus dem gereinigten Immunglobulin wird das erhaltene Immunglobulin entweder durch Äthanol-Fällung in der Kälte ausgefällt oder es wird mit einem Kationenaustauscher behandelt. Der beladene Katio-
30 nenaustauscher wird danach gründlich gewaschen. Sodann wird das adsorbierte Immunglobulin mit einer Lösung hoher Salzkonzentration, z. B. einer konzentrierten Kochsalzlösung, eluiert. Man erhält ein hochreines Immunglobulin zur intravenösen Gabe mit extrem niedriger antikomplementärer Aktivität.

Die Erfindung betrifft somit den in den Patentansprüchen ge-

1 kennzeichneten Gegenstand. Vorzugsweise wird als rohes Immunglobulin die Cohn-Fraktion II, d.h. Standard-Immunglobulin, eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachstehend noch näher erläutert.

Eine Immunglobulinpaste oder ein lyophilisiertes Immunglobulin-Präparat, z. B. die Cohn-Fraktion II, wird in einer Kochsalzlösung gelöst, die Aminoessigsäure ent-
10 hält. Die Proteinkonzentration wird auf einen Wert von 3,0 bis 5,0 % (Gew./Vol.) und der pH-Wert auf 6,0 bis 7,0 eingestellt. Sodann wird die erhaltene Lösung mit PEG 4000 auf eine Konzentration von 6,0 bis 7,0 % (Gew./Vol.) eingestellt. Die entstandene Fällung von aggregierten Immunglobulinen
15 wird abgeschleudert.

Die Konzentrationen an Aminoessigsäure (Glykokoll) und Natriumchlorid betragen vorzugsweise 0,5 bis 2,0 % (Gew./Vol.) bzw. 0,5 bis 1,5 % (Gew./Vol.). Aminoessigsäure-Konzentrationen
20 außerhalb des angegebenen Bereichs ergeben unbefriedigende Ergebnisse bei der fraktionierenden Fällung.

Danach wird der pH-Wert des Überstandes auf 7,0 bis 8,0 eingestellt und PEG 4000 wird bis zu einer Konzentration von
25 10,0 bis 15,0 % (Gew./Vol.) zugegeben. Die entstandene Fällung, die hauptsächlich aus monomerem Immunglobulin besteht, wird abgeschleudert.

Die erhaltene Fällung wird in 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst, die einen Stabilisator für die Gefriertrocknung enthält, z.B. 2,5 % (Gew./Vol.) Glucose. Die erhaltene Lösung wird filtriert, sterilisiert und gefriergetrocknet. Es wird ein Immunglobulin-Trockenpräparat erhalten.

35 Das erhaltene Immunglobulin-Präparat hat eine niedrige antikomplementäre Aktivität (Komplementaktivität) und kann

1 intravenös gegeben werden. Das Präparat kann weiter gereinigt
werden. Zu diesem Zweck wird die Fällung z.B. in einer 0,03
bis 0,07 molaren Kochsalzlösung oder in einer 0,03 bis 0,06 mo-
laren Kochsalzlösung gelöst, die 0,01 molar Phosphatpuffer
5 enthält, und die Proteinkonzentration wird auf 5,0 bis 10,0 %
(Gew./Vol.) und der pH-Wert auf 7,0 bis 7,5 eingestellt. So-
dann wird die erhaltene Lösung auf eine mit einem Anionen-
austauscher gefüllte Säule aufgesetzt. Der Anionenaustauscher
wurde vorher mit der gleichen Lösung äquilibriert. Als Anio-
10 nenaustauscher kann z.B. DEAE Sephadex A-50, DEAE Sepharose
CL-6B, QAE Sephadex A-50, DEA Cellulofine AH oder Spherosil
DEA verwendet werden. Durch diese Behandlung wird ein Immun-
globulin-Präparat mit noch niedrigerer Komplementaktivität
erhalten.

15
In Japan wird die antikomplementäre Aktivität als befriedi-
gend angesehen, wenn nicht mehr als 20 CH_{50} Komplement ver-
braucht werden beim Vermischen der gleichen Mengen einer
50 mg/ml Lösung von Immunglobulin und einer 100 CH_{50} /ml Lö-
20 sung von Komplement und einstündiges Stehen des Gemisches bei
37°C. Der Mindestwert des biologischen Produkts beträgt nicht
mehr als 0,4 CH_{50} /mg Protein. Dementsprechend soll ein Immun-
globulin-Präparat zur intravenösen Applikation eine anti-
komplementäre Aktivität von nicht mehr als 0,4 CH_{50} /mg
25 Protein aufweisen.

Der PEG-Gehalt des Präparats kann herabgesetzt werden, wenn
man eine auf die vorstehend beschriebene Weise erhaltene Lö-
sung von Immunglobulin, d.h. eine durch Auflösen der PEG-Fäl-
30 lung oder durch Behandlung mit dem Anionenaustauscher erhal-
tene Lösung bei niedriger Temperatur mit Äthanol auf 25 %
nach der Methode von Cohn einstellt und die erhaltene Fäl-
lung abschleudert.

35 Der PEG-Gehalt kann auch dadurch vermindert werden, daß man
das Immunglobulin in einer 0,03 bis 0,07 molaren Lösung von

- 1 Natriumchlorid oder einer einen Phosphatpuffer enthaltenden
Natriumchloridlösung löst, die erhaltene Lösung bei einem pH-
Wert von 5,0 bis 6,0 mit einem Kationenaustauscher behandelt,
wie CM-Sephadex C-50, CM Sepharose CL-6B, SP Sephadex C-50,
5 CM-Cellulofine oder Spherosil C , um das Immunglo-
bulin am Kationenaustauscher zu adsorbieren. Danach wird die
Austauschersäule zur Abtrennung des PEG gewaschen und sodann
das Immunglobulin mit einer Lösung hoher Salzkonzentration, z.B. einer
0,15 molaren Kochsalzlösung, bei einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5 eluiert.

In den Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren weiter erläutert.
PEG bedeutet Polyäthylenglykol 4000.

B e i s p i e l 1

- 15 300 g einer durch Fraktionierung mit kaltem Äthanol nach
Cohn erhaltenen Immunglobulinpaste Fraktion II werden in einer
0,5%igen Lösung von Aminoessigsäure gelöst, die 0,9 % Na-
triumchlorid enthält. Der pH-Wert der erhaltenen Lösung
wird mit 0,5n Salzsäure auf 6,0 eingestellt. Sodann wird
20 die Lösung auf 1000 ml verdünnt. Die Proteinkonzentration
beträgt 3,8 % und die antikomplementäre Aktivität 1000 Ein-
heiten pro mg.

- Die erhaltene Lösung wird tropfenweise und unter langsamem
25 Rühren mit 177 ml einer 40%igen PEG-Lösung versetzt (PEG
6,0 %). Die entstandene Fällung wird abzentrifugiert. Da-
nach wird der pH-Wert des Überstandes mit 0,5n Natronlauge
auf 7,5 eingestellt. Hierauf werden 260 ml einer 40%igen
PEG-Lösung zugegeben (PEG 12 %) und die entstandene Fällung
30 wird abzentrifugiert. Die erhaltene Fällung enthält keine
aggregierten Immunglobuline und zeigt eine antikomplementä-
re Aktivität von 0,3 Einheiten pro mg nach dem Auflösen in
einer 2,5%igen Glucoselösung, die 0,9 % Natriumchlorid ent-
hält. Die erhaltene Lösung wird filtriert, sterilisiert und
35 gefriergetrocknet. Es wird ein Trockenpräparat erhalten, das
nach dem Auflösen in einem geeigneten Lösungsmittel intra-

1 venös appliziert werden kann.

B e i s p i e l 2

100 g der Immunglobulin-Cohn-Fraktion II als getrocknetes
5 Pulver werden in einer 1%igen Lösung von Aminoessigsäure ge-
löst, die 0,9 % Natriumchlorid enthält. Danach wird der pH-
Wert der erhaltenen Lösung mit 0,5n Salzsäure auf 6,5 einge-
stellt und die Lösung auf 1000 ml verdünnt. Die Proteinkon-
zentration beträgt 3,9 % und die antikomplementäre Aktivität
10 8 Einheiten pro mg.

Hierauf wird die Lösung unter langsamem Rühren mit 194 ml
einer 40%igen PEG-Lösung versetzt (PEG 6,5 %). Die entstan-
dene Fällung wird abzentrifugiert. Der pH-Wert des Überstan-
15 des wird mit 0,5n Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Danach
werden 250 ml einer 40%igen PEG-Lösung zugegeben (PEG 13 %),
und die erhaltene Fällung wird abzentrifugiert.

Das erhaltene Sediment wird in 200 ml einer 0,5%igen Lösung
20 von Glykokoll gelöst, die 0,5 % Natriumchlorid enthält. Die
erhaltene Lösung hat einen pH-Wert von 7,2 und eine anti-
komplementäre Aktivität von 0,3 Einheiten pro mg. Sie wird
auf eine DEAE-Sephadex A-50 Säule (Durchmesser 5 cm, Länge
15 cm) aufgesetzt, die mit der gleichen Lösung vorher äqui-
25 libriert worden war. Nach dem Passieren durch die Säule wird
die Lösung auf eine Proteinkonzentration von 5 %, eine Glu-
cosekonzentration von 2,5 % und eine Natriumchlorid-Konzen-
tration von 0,9 % eingestellt. Die antikomplementäre Aktivi-
tät beträgt 0,2 Einheiten pro mg. Die Lösung wird filtriert,
30 sterilisiert und gefriergetrocknet. Es wird ein Trockenpräpa-
rat erhalten, das nach dem Lösen in einem geeigneten Lösungs-
mittel intravenös appliziert werden kann.

B e i s p i e l 3

35 Eine auf die gleiche Weise wie in Beispiel 2 erhaltene
Immunglobulin-Lösung wird mit 0,9%iger Natriumchloridlösung

- 1 auf 600 ml eingestellt und abgekühlt. Sodann werden tropfenweise 530 ml 53,3%iges wäßriges Äthanol nach der Methode von Cohn zugegeben (Äthanol-Konzentration 25 %). Die entstandene Fällung wird abzentrifugiert. Das Sediment wird in einer wäßrigen Lösung gelöst. Die Endkonzentration dieser Lösung an Glucose beträgt 2,5 %, an Natriumchlorid 0,9 % und an Protein 5,0 %. Die erhaltene Lösung hat eine antikomplementäre Aktivität von 9 Einheiten pro ml.
- 10 Die erhaltene Lösung wird filtriert, sterilisiert und gefriergetrocknet. Es wird ein Trockenpräparat erhalten, das nach dem Auflösen in einem geeigneten Lösungsmittel intravenös appliziert werden kann.
- 15 Eine auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 erhaltene Immunglobulin-Lösung wird auf die vorstehend beschriebene Weise behandelt. Die erhaltene Lösung hat eine antikomplementäre Aktivität von 14 Einheiten pro ml.

20 B e i s p i e l 4

- Eine auf die gleiche Weise wie in Beispiel 2 erhaltene Immunglobulin-Lösung wird auf eine Natriumchlorid-Konzentration von 0,25 % und eine Glykokoll-Konzentration von 0,25 % eingestellt. Der pH-Wert wird auf 5,5 eingestellt. Sodann wird die Lösung auf eine mit CM-Sepharose CL-6B gefüllte Säule mit einem Durchmesser von 5,0 cm und einer Länge von 15 cm aufgesetzt. Die Säule ist vorher mit der gleichen Lösung äquilibriert worden. Das Immunglobulin wird an der Füllung adsorbiert. Anschließend wird die Säule mit der zur Äquilibrierung verwendeten Lösung gründlich gewaschen. Danach wird das adsorbierte Immunglobulin mit einer 2,5%igen Lösung von Glucose mit 0,9 % Natriumchlorid und einem pH-Wert von 7,0 eluiert.
- 30
- 35 Das Eluat wird auf eine Proteinkonzentration von 5 % eingestellt. Es zeigt eine antikomplementäre Aktivität von 8 Ein-

1 heiten. Die Lösung wird filtriert, sterilisiert und gefrier-
getrocknet. Es wird ein Trockenpräparat erhalten, das nach
dem Auflösen in einem geeigneten Lösungsmittel intravenös ge-
geben werden kann.

5

Eine auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 hergestellte
Immunglobulin-Lösung wird auf die vorstehend beschriebene
Weise behandelt. Die erhaltene Lösung zeigt eine antikomple-
mentäre Aktivität von 13 Einheiten pro ml.

10

15

20

25

30

35